

DIAGNOSE VERSCHIEDENER TYPEN VON

GLYKOGENSPEICHERKRANKHEITEN

AUS BLUTBESTANDTEILEN

ERHÖHTE AKTIVITÄT DER AMYLO - 1,6 - GLUCOSIDASE

IN DEN ERYTHROZYTEN BEI DER

GLYKOGENOSE TYP VIa

HANS KOPP

1986

Aus der
Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Vorstand: Prof. Dr. H.B. Hadorn

Diagnose verschiedener Typen von Glykogenspeicher-
krankheiten aus Blutbestandteilen.

Erhöhte Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase in den
Erythrozyten bei der Glykogenose Typ VIa.

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians- Universität
zu München

vorgelegt von
Hans Kopp
aus Oberammergau
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.W.Endres
Mitberichterstatter: 1.Prof.Dr.med.H.B.Hadorn
2.Prof.Dr.med.A.Fateh-Moghadam
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.nat.Y.S.Shin
Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 11.Dezember 1986

Verzeichnis der

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Für meine Mutter

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1.	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Aufgabenstellung	9
2.	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.2	Methoden	12
2.2.1	Aufbereitung der Gewebe	12
2.2.2	Meßmethoden	13
2.2.3	Das Prinzip der Enzymkinetik	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Glykogenose Typ I	30
3.2	Glykogenosen Typ III, V, VIa und Glykogensynthesestörung	41
4.	Diskussion	45
5.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	48
6.	Literaturverzeichnis	49
	Lebenslauf	55

Zusammenfassung

Differentialdiagnose der Glykogenosen aus Blutbestandteilen

Die Glykogenose Typ I muß bisher aus Leberbiopsien diagnostiziert werden. Dazu wird eine spektrophotometrische Methode angewandt, bei der Phosphat gemessen wird.

Um den Mangel an Glucose-6-Phosphatase in Blutbestandteilen feststellen zu können, wurde ein enzymatischer Test mit ^{14}C -markiertem Substrat (^{14}C - Glucose-6-Phosphat) eingeführt. Bei Anwendung dieses Tests auf Lebergewebe konnte gezeigt werden, daß damit die Messung der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase durchführbar ist.

Im Vergleich mit der spektrophotometrischen Methode (2,8 - 3,5 nmol/min/mg Protein) ergaben sich niedrigere Werte (0,9 - 1,3 nmol/min/mg Protein), entsprechend der verwendeten niedrigen Substratkonzentrationen.

Bei Anwendung dieser Methode auf Leukozyten konnte die Glucose-6-Phosphatase ebenfalls gemessen werden (1,3 - 5,5 nmol/min/mg Protein).

Die Methode der Glykogenreinigung, die bei der Messung der Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase und der Muskelphosphorylase angewendet wird, konnte vereinfacht werden.

In den Erythrozyten der Glykogenosen Typ III und Typ VIa wurde ein extrem erhöhter Glykogengehalt gefunden (3 - 52 mg/g Hb), bei einem Normalwert von bis zu 0,36 mg/g Hb.

Interessant ist das Ergebnis, daß die Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase bei der Glykogenose Typ VIa signifikant erhöht ist (7 - 12 bei Normalwerten von 1,5 - 3,8 nmol/min/g Hb).

1. Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Einleitung

Der Franzose Claude Bernard (1813 - 1878) hat das Glykogen ("Leberstärke") entdeckt und benannt, er wußte bereits, daß die Glykogensynthese in der Leber stattfindet (17).

Die Glykogenspeicherkrankheiten oder Glykogenosen sind Stoffwechselerkrankungen, bei denen das Reservekohlenhydrat Glykogen in verschiedenen Körpergeweben pathologisch gespeichert wird.

Die Ursache sind genetisch bedingte Enzymdefekte im Synthese- oder Abbauweg des Glykogens, die die Speicherung des normalen oder eines falsch strukturierten Glykogens zur Folge haben.

Die Glykogenbiosynthese findet praktisch in jedem Gewebe des Organismus statt. Die Leber enthält bis zu 6g Glykogen pro 100g Frischgewicht, Muskel bis zu 2g pro 100g Frischgewicht. Das Molekulargewicht des Glykogens schwankt zwischen 10^6 und $1,6 \times 10^7$ (17).

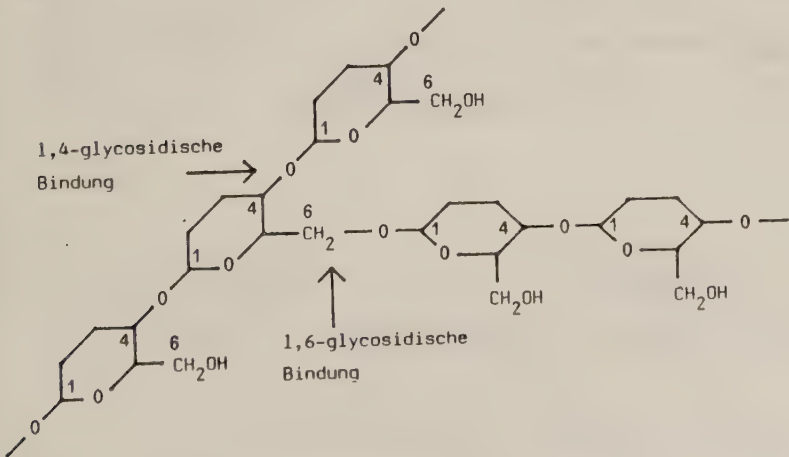


Abb. 1 Verzweigungsstelle eines Glykogenmoleküls

Die Glykogenbiosynthese

Gestartet wird die Glykogenbiosynthese durch Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat, welches durch das Enzym Phosphoglucumutase in Glucose-1-Phosphat übergeführt wird. Dieses reagiert mit Uridin-Triphosphat zu Uridin-Diphosphatglucose (Enzym: UDPG-Pyrophosphorylase).

Die Glykogen-Synthetase bildet 1,4-glykosidische Bindungen zwischen der UDPG und dem Starter-Glykogen. Nach Erreichen einer bestimmten Kettenlänge werden über die Amylo-1,4-1,6-Transglucosidase ("branching-enzyme") 1,6-glykosidische Bindungen gebildet, wodurch die Verzweigungspunkte des Glykogens entstehen.

Die Glykogen-Synthetase ist ein interconvertierbares Enzym, dessen Aktivität durch chemische Modifikation am Enzymprotein gesteuert werden kann.

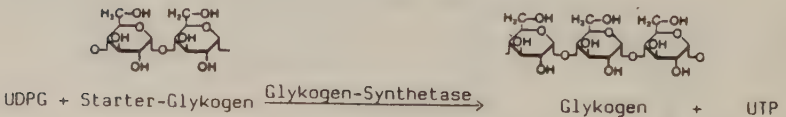
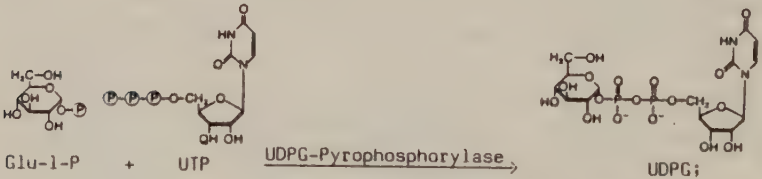
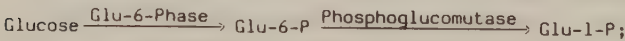


Abb.2 Reaktionsfolge der Glykogensynthese

Die Glykogenolyse (17,18)

Der Abbau des Glykogens wird durch die Phosphorylase, welche die 1,4-Bindungen des Glykogens spaltet, gestartet. Dabei entsteht Glucose-1-Phosphat.

Die Phosphorylase ist ein interconvertierbares Enzym, dessen Aktivität durch chemische Modifikation gesteuert werden kann. Phosphorylase a ist die aktive, Phosphorylase b die passive Form.

Der Phosphorylaseschritt ist für die Glykogenolyse geschwindigkeitsbestimmend.

Das Enzym α -1,4- α -1,4-Glucan-Transferase dient dazu, die Verzweigungsstellen freizulegen.

Die Spaltung der 1,6-glycosidischen Bindungen erfolgt mit Hilfe der Amylo-1,6-Glucosidase ("debranching-enzyme"). Dabei wird freie Glucose gebildet.

Durch die Wirkung dieser drei Enzyme wird Glykogen zu Glucose-1-Phosphat abgebaut, welches über die Phosphoglucomutase - Reaktion in Glucose-6-Phosphat umgewandelt wird.

In Leber und Niere, aber nicht in der Muskulatur, spaltet eine spezifische Glucose-6-Phosphatase den Phosphatrest des Glucose-6-Phosphats ab, wobei freie Glucose entsteht.

Die saure 1,4- α -glucosidase hydrolysiert Maltose, dabei entsteht ebenfalls freie Glucose.

Einteilung der Glykogenosen

Die Glykogenosen wurden erstmals von von GIERKE (1929) (13) und von POMPE (1932) (36) beschrieben.

Die heutige Einteilung ist der Tabelle zu entnehmen (Tab.1, Seite 8).

Beim Typ I sind die Leitsymptome die im ersten Lebensjahr auftretende Hepatomegalie und rezidivierende Hypoglykämien, die bei Nichtbehandlung die geistige Entwicklung beeinträchtigen können. Charakteristisch sind weiterhin Hungerazidosen und das Fehlen von Zeichen einer Leberzirrhose und portaler Hypertension. Eine Nierenvergrößerung ist meist nur röntgenologisch nachweisbar, das Wachstum ist verzögert. Eine sekundäre Fettstoffwechselstörung kann zu Fettansatz im Gesicht ("Puppengesicht") und Xanthomen an den Extremitäten führen. Aufgrund einer Thrombozytenaggregationsstörung besteht die Neigung zu einer hämorrhagischen Diathese (18,19,27).

Der Typ I wird weiter unterteilt in Typ Ia und Typ Ib.

Beim Typ Ia ist keine Aktivität der Glucose-6-Phosphatase nachweisbar (41), beim Typ Ib ist sie bei üblicher Verarbeitung des Gewebes normal hoch, die Umwandlung von Glucose-6-phosphat zu Glucose ist jedoch gleichfalls gestört. Die klinische Symptomatik ist die selbe, zusätzlich besteht häufig eine Neutropenie mit Neigung zu Infektionen (12,34,35,38). Der Defekt liegt in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, wo eine Glucose-6-Phosphat - spezifische Translocase fehlt und somit der Transport in die Microsomen nicht möglich ist (11,24, 26,28,33).

Ziel der Therapie des Typ I ist die Verminderung der Hypoglykämien, es werden häufige Mahlzeiten gegeben, nachts wird die Nahrung über eine Magensonde zugeführt (15,16). Der Kohlenhydratanteil besteht vorwiegend aus Glucose, auch Stärke wird verwendet (6). Unter dieser Diät konnten Leberadenome, die den Typ I häufig begleiten, zur Regression gebracht werden (35).

Die Behandlung der Adenome ist deshalb von Bedeutung, weil daraus beim Typ I häufig bösartige Lebertumoren entstehen (2). Die Behandlung verbessert ebenso die veränderten Laborparameter (Tab.1, Seite 8) und die Größe der Leber verringert sich (14,15,16). Die erhöhten Laktatspiegel normalisieren sich am besten unter Dextroseinfusionen (42).

Mit zunehmenden Alter nimmt die Tendenz zur Hypoglykämie ab, da sich das Gehirn adaptiert und die anderen Gewebe alternative Brennstoffe utilisieren. Die Fähigkeit, Glucose zu produzieren, scheint ebenfalls zuzunehmen, eventuell durch einen erhöhten Glykogenstoffwechsel (erhöhte Aktivität des "debranching - enzyme") (26).

Das Fehlen der Glucose-6-Phosphatase in der Leber wurde erstmals von CORI und CORI 1952 nachgewiesen (8).

Je nachdem, wann die Krankheit zum Tode führt, unterscheidet man beim Typ II, Morbus POMPE, eine infantile, juvenile und adulte Form (39). Bei der häufigsten, der infantilen Verlaufsform, treten kurz nach der Geburt oder im ersten Lebensjahr Kardiomegalie, Muskelschwäche und Areflexie auf. Ein weiteres Zeichen ist die Makroglossie (19,39). Der Tod durch Herzinsuffizienz tritt spätestens im zweiten Lebensjahr ein. Man kann eine betont kardiomegale von einer betont neuromuskulären Form unterscheiden (44).

Die klinischen Unterschiede beruhen darauf, daß für die α -1,4-Glucosidase genetische Heterogenität besteht (4).

Den Enzymmangel nachgewiesen hat HERS 1963 (21).

Eine Therapie ist nicht bekannt.

Ein ähnliches Bild macht eine andere Speicherkrankheit, bei der Äthanolamin gespeichert wird (47).

Typisch für die Glykogenose Typ III ist eine Morgenhypoglykämie. Hepatomegalie und Wachstumsstörungen treten zwar auf, sind aber nicht so stark ausgeprägt wie beim Typ I (39). Die Muskulatur ist leicht ermüdbar. Die Patienten erreichen das Erwachsenenalter und sind in ihrer geistigen Entwicklung nicht beeinträchtigt, allerdings gibt es auch eine schwer verlaufende Form. Inzwischen wird diese Glykogenose in vier Untergruppen eingeteilt, da der Defekt auch im Herz- und Skelettmuskel auftritt (39).

Ebenso kommt der Enzymdefekt in Leukozyten (48) und Erythrozyten (22) vor. Das Fehlen der Amylo-1,6-Glucosidase in der Leber haben als erste ILLINGWORTH und CORI 1956 nachgewiesen (25). Erstbeschreiber war FORBES 1953 (10). Therapiert wird diese Glykogenose wie der Typ I (39).

Hepato- und Splenomegalie, Leberzirrhose, portale Stauung, Aszites, Ikterus und Hämorrhagien kennzeichnen eine weitere, seltene Glykogenose, den Typ IV. Alle Patienten versterben im ersten bis zweiten Lebensjahrzehnt an intestinalen Blutungen oder Pneumonien, eine Therapie ist nicht bekannt. Der Defekt der Amylo-1,4-1,6-Glucosidase konnte von BROWN und BROWN 1983 in Fibroblasten nachgewiesen werden (5). Eine erhöhte Aktivität dieses Enzyms wurde in Zusammenhang mit der progressiven myoklonischen Epilepsie Typ Lafora gefunden (49).

Erstmals beschrieben wurde der Typ IV von ANDERSEN 1956 (1). 1951 beschrieb McARDLE die Glykogenose Typ V (31). Es zeigen sich keine Erscheinungen in Körperruhe, im zweiten Lebensjahr treten leichte Ermüdbarkeit und Muskelsteife auf. Im frühen Erwachsenenalter Krämpfe, Schwäche und Atrophie der Muskulatur, die Lebensdauer ist nicht verkürzt (19). Therapeutisch verbessern Glucagon und Glucose die Muskelkraft. Die Verminderung der Muskelphosphorylase konnten MOMMAERTS und SCHMID 1959 nachweisen (32). Bei zwei Patienten wurde im Muskel keine messenger-RNA für das Enzym gefunden (9).

Die Glykogenose Typ VI wird in zwei Formen unterteilt. Beim Typ VIa, dem Phosphorylase-b-Kinase - Mangel, besteht eine leichte Hepatomegalie, Hypoglykämien treten nur nach langem Fasten auf. Der Defekt wird x-chromosomal rezessiv vererbt, im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Glykogenosen.

Erstbeschreiber war HUIZING 1967 (23).

Der Leberphosphorylasemangel wurde zuerst von HERS 1959 (20) beschrieben. Diese als Typ VIb bezeichnete Form macht leichter Hypoglykämien, zeigt aber auch keine weiteren metabolischen Veränderungen (39). Von BASHAN et al. wurde 1981 ein Fall einer Glykogenose beschrieben, bei der ein Phosphorylase-Kinase - Mangel in Leber und Muskel nachgewiesen werden konnte (3).

Die Therapie beim Typ VI besteht im Vermeiden von Fastenperioden.

Erstbeschreiber der Glykogenose Typ VII war TARUI 1965 (45). Dabei handelt es sich um einen Mangel an Muskel-Phosphofructokinase, der zu schmerzhaften Muskelkrämpfen nach Anstrengungen führt. Schwere Muskelbelastungen sollten vermieden werden, es werden Fructose - Infusionen verabreicht.

Der Defekt der Glykogen - Synthetase (UDPG-Transferase) führt zur Glykogenmangel - Krankheit, die erstmals von LEWIS (29) 1962 beschrieben wurde. Es kommt zu hypoglykämischen Krämpfen, die Therapie besteht in vielen, kleinen, kohlenhydratreichen Mahlzeiten.

Tab.1 Einteilung der Glykogenosen (41)

NOM. HAU. IQC II	VERBENG	ENZYMDIJEKT	KATALYSIERTE REAKTION	ENZYM- AKTIVITÄT	Q. VON EN- STIRKUR	BE TROFFEN. ORGANE	LABORPARAMETER
Typ I, var. GII 180	autosomal rezessiv	Glucose-6- Phosphatase	Glucose-6-Phosphat $\rightarrow$ Glucose	keine	normal	Leber, Niere, Dünndarm	Leberfunktionsproben normal, GOT, GPT, LDH können leicht erhöht sein, Plasma: Laktat, Pyruvat, freie FS, Lipide, Cholesterin, Ke- torkörper erhöht, Glucosegabelastung: Laktatanstieg, Glucose normal
Typ II, POMC ca. 1:100.000	autosomal rezessiv	lysosomale α -1,4-Glu- cosidase	Maltose $\rightarrow$ Glucose	keine	normal	Herz, Leber, Skelettmuskulatur	Blutzuckerwerte und Serumfettlipidspiegel normal, keine Azidose, keine Ketose, Glucose- gabelastung: normaler Blutzuckeranstieg
Typ III, CORN/ FORS ca. 1:100.00	autosomal rezessiv	Amylo-1,6- Glucosidase (debranching enzyme)	Hydrolyse von α - 1,6-Glycosidbindungen es entsteht freie Glucose	vermindert	abnorm, "Crenz- dextrin"	Leber, Skelet- muskulatur	Nachtemblutucker leicht gesenkt, Blutfette deutlich erhöht
Typ IV, ANDERSEN ca. 1:500.000	autosomal rezessiv	Amylo-1,4-1,6 Transglucosyl- dase (branching enzyme)	1,6-glycosidische Bun- dungen können nicht ge- bildet werden	vermindert	abnorm, verkürzte Verzwei- gungen	Leber, Milz, Lymphknoten	Leberfunktionsproben stark pathologisch
Typ V, McARDLE ca. 1:500.000	autosomal rezessiv	Muskel-Phos- phorylase	Spaltung der 1,4-glyco- sidischen Bindungen $\rightarrow$ Glucose-1-Phosphat	keine oder vermindert	normal	Skelettmuskulatur	Nach Muskelarbeit fehlt der Laktatan- stieg im Blut
Typ VIa ca. 1:100.000	x-gabunden rezessiv	Phosphorylase -b-Kinase	Einere der Phosphoryla- se b $\rightarrow$ aktive Phospho- rylase a	vermindert	normal	Leber	
Typ VI, HERS ca. 1:200.000	autosomal rezessiv	Leber-Phos- phorylase	Spaltung der 1,4-glyco- sidischen Bindungen $\rightarrow$ Glucose-1-Phosphat	vermindert	normal	Leber	Nachtemblutucker leicht vermindert, un- zureichender Anstieg nach Glucosegabelast. Blutfette, Bilirubin, Transaminasen erhöht
Typ VII, TARUI ca. 1:500.000	autosomal rezessiv	Muskelphosphat fruktokinase	fructose-6-Phosphat $\rightarrow$ fructose-1,6-Diphosphat	vermindert	normal	Skelettmuskulatur	Nach Belastung Myoglobinurie und Erhöhung der Enzyme CK, Aldolase, LDH

1.2 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war, die Möglichkeiten der Differentialdiagnose der Glykogenspeicherkrankheiten aus Blutbestandteilen zu erweitern. Bisher war es notwendig, für die Diagnose des Typ I bioptisch Lebergewebe zu gewinnen.

Es sollte versucht werden, mit Hilfe des mit ^{14}C - markierten Substrats das Enzym Glucose-6-Phosphatase zu messen.

Vorher sollte diese Methode auf Lebergewebe angewandt und mit der spektrophotometrischen Methode verglichen werden.

Die Methoden zum Nachweis des Enzymmangels bei den Typen III und V aus Erythrozyten (19,20) beinhalten jeweils einen zeitraubenden Schritt der Glykogenreinigung. Dieser sollte verbessert und verkürzt werden.

Weitere Untersuchungen waren vorgesehen, die Untertypen der Glykogenose Typ I, Ia und Ib zu unterscheiden und eine Glykogensynthesestörung, den Mangel an Glykogensynthetase, nachzuweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

- Geräte:
- Eppendorf - Photometer
 - Zentrifugen: Hettich Mikroliter
Hettich Rotixa/KS
 - Homogenisierapparat: B.Braun, Melsungen
 - Digital - pH - Meter der Fa. Orion - research
 - Heizblock 37°C, 95°C
 - Gefrierschrank Linde, Temp. -15°C
 - Kühlschrank Bosch
 - Säulenständer nach eigener Anfertigung
 - 2ml - Plastikspritzen ohne Stempel
 - Vials der Fa. Zinsser - Analytik GmbH
 - "servo - tray" - Träger der Fa. Packard
 - Eppendorf - Reaktionsgefäße
 - Eppendorf - Pipetten
 - Einmalküvetten, Einmalreagenzgläser
 - Glasreagenzgläser
 - Szintillationszähler

- Chemikalien:
- Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphatase, Glycogen(Typ III), Amyloglucosidase, DEAE - Cellulose, TCA, Coffein: Sigma - Chemical Co., Deutsche Niederlassung München
 - ^{14}C -Glucose (250 μl =50 μCi): Fa. Amersham, England
 - ^{14}C -Glucose-6-Phosphat (40-60mCi/mmol), ^{14}C -UDPG, ^{14}C -Glucose-1-Phosphat (200mCi/mmol): NEN, New England Nuclear Chemicals GmbH
 - EDTA, NaAc, NaF, Tris-HCl, Na_2SO_4 , AMP, D-Glucose Äthanol, Na_2CO_3 , CuSO_4 , Na-K-Tartrat(Seignettesalz, Folin Ciocalteus Phenolreagenz: Fa. Merck, Darmstadt
 - Transformationslösung zur Hb - Bestimmung: Apotheke der klinischen Universitätsanstalten München
 - Szintillationsflüssigkeit Quickszint 212: Zinsser Analytik GmbH

Biologisches Material

Verwendet wurde Leber-, Nieren-, Dünndarm-, Hirn- und Muskelgewebe Verstorbener, die zur Sektion in das Institut für Rechtsmedizin der Universität München gelangten, welches durch freundliches Entgegenkommen die Gewebsentnahme ermöglichte, die nicht später als 24 Stunden post mortem erfolgte. Die entnommenen Gewebeteile wurden sofort in Eis gelagert und transportiert, in einem Kühlraum in kleine Stücke geschnitten und in Plastikgefäßen eingefroren. Es wurde darauf geachtet, bindegewebige Anteile möglichst zu entfernen. Weiterhin wurde bioptisch gewonnenes Leber- und Muskelgewebe von Patienten verwendet, das ebenfalls sofort nach der Entnahme eingefroren wurde. Erythrozyten und Leukozyten stammten von Patienten und gesunden Kontrollpersonen, Amnionzellen und Fibroblasten aus Zellkulturen.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung der Gewebe

Herstellung eines Homogenats

Gefrorene Gewebestücke werden im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und in einem Braun - Mixer homogenisiert. Es muß ständig in Eis gearbeitet werden.

Das Homogenat wird drei mal abzentrifugiert (mit 10.000g für 10min), das Sediment wird jeweils verworfen.

Herstellung der Leukozyten- und Erythrozytenpräparate (26)

5ml frisches, durch Venenpunktion gewonnenes Blut werden mit 1ml Leukozytenlösung (Dextran und Heparin) vermischt (im Reagenzglas, Umrühren mit Plastikspatel), der dabei entstehende Schaum wird vorsichtig abpipettiert.

Das Reagenzglas läßt man nun eine Stunde stehen, die Erythrozyten setzen sich ab. Das überstehende Plasma wird abpipettiert und auf zwei Eppendorf - Reaktionsgefäße verteilt. Das Plasma wird zentrifugiert, der Überstand wird verworfen.

Das Sediment wird mit jeweils 100µl 0,1%iger Essigsäure gemischt (unter Verwendung eines Rüttlers und Einblasen von Luft mit der Pipette), dann werden 1000µl 0,7%ige NaCl-Lösung zugegeben, zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Dieser Vorgang wird wiederholt, er dient dazu, die restlichen Erythrozyten zu zerstören.

Jetzt wird das Sediment noch einmal mit NaCl gewaschen, der Überstand verworfen und dann das Sediment eingefroren. Die Erythrozyten werden auf vier Eppendorf - Reaktionsgefäße verteilt, drei mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann eingefroren.

2.2.2 Me0methoden

Das Prinzip der Messung von Enzymaktivitäten beruht darauf, die von dem Enzym katalysierte Reaktion unter standardisierten, optimalen Bedingungen ablaufen zu lassen.

Bestimmt wird dann die Konzentration des restlichen Substrats oder die der Produkte, als Maß für die Aktivität des Enzyms.

Messung der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (EC 3.1.3.9) (Glykogenose Typ I)

Methode 1: Spektrophotometrische Messung nach HERS (19)

Testprinzip:

Glucose-6-Phosphat $\xrightarrow{\text{Glucose-6-Phosphatase}}$ Phosphat + Glucose

Homogenat:

Gewebe + H₂O

Reagenzien:

Glucose-6-Phosphat 0,1 mol/l + EDTA 0,002 mol/l, pH 6,5

Natriumacetat - Puffer 0,1 mol/l, pH 5,0

Ansatz und Durchführung:

1: 30µl Homogenat + 5µl H₂O

2: 30µl Homogenat + 5µl Na-Ac-Puffer

3: 30µl Homogenat + 5µl H₂O

Das Homogenat wird im Eiswasserbad in Eppendorf - Reaktionsgefäße pipettiert (jeweils Duplikat) und anschließend mit den entsprechenden Reagenzien 5min bei 37°C inkubiert.

Modifikation: Ansatz 1 wird nicht inkubiert.

Ansatz 3 wird zusätzlich 5min bei 95°C geheizt.

Anschließend werden zu allen Proben je 30µl Glucose-6-Phosphat pipettiert und 120min bei 37°C inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch 5minütiges Heizen bei 95°C. Bei jeder Zugabe von Reagenzien wird das jeweilige Reaktionsgefäß geschüttelt.

Erläuterung:

Bei Ansatz 1 läuft die Reaktion unter optimalen Bedingungen ab (Substratsättigung, Temperatur- und pH-Optimum). Es wird die Aktivität aller in der Probe vorhandenen Phosphatasen gemessen. Durch Zugabe des Puffers in Ansatz 2 werden die unspezifischen Phosphatasen zerstört. Die Differenz der Mengen des entstandenen Produkts ist also ein Maß für die Aktivität des spezifischen Enzyms.

Ansatz 3 wird vor Beginn der Reaktion denaturiert, er liefert die Leerwerte.

Phosphatmessung

Testprinzip:

Das anorganische Phosphat bildet mit Natriummolybdat Phosphormolybdat. Durch Reduktion wird das Phosphormolybdat in kolloidales Molybdänblau überführt, dieses ist proportional der Menge des vorhandenen Phosphats.

Reagenzien:

Lsg. 1:	Bisulfat - Borat - Lsg.	150µl
Lsg. 2:	Molybdat - Lsg.	20µl
Lsg. 3:	Reduktions - Lsg.	20µl
Lsg. 4:	Sulfit - Carbonat - Lsg.	150µl

Durchführung:

Es werden je 20µl Überstand der zu messenden Probe in ein Eppendorf - Reaktionsgefäß pipettiert (jeweils Duplikat) und die Reagenzien in der oben genannten Reihenfolge zugegeben. Beim Pipettieren der Reduktionslösung wird das Gefäß geschüttelt, ebenso nach Zugabe der Sulfit - Carbonat - Lösung. Nach 15min wird die Extinktion bei 623nm gegen den Nullpunkt Luft abgelesen.

Methode 2: Messung der Radioaktivität (37)

Testprinzip:



Reagenzien:

Glucose-6-Phosphat + EDTA 0,0025 mol/l, pH 6,5

Natriumacetat - Puffer 0,1 mol/l, pH 5,0

^{14}C -Glucose-6-Phosphat

Ansatz und Durchführung:

wie bei Methode 1, statt mit Glucose-6-Phosphat wird jedoch mit einem Gemisch aus

2 Teilen Glu-6-P (10,20,50 und 100mmol/l)

1 Teil ^{14}C -Glu-6-P (10µCi/ml)

3 Teilen Cacodylsäurepuffer

inkubiert.

Der Überstand wird jeweils auf eine Mikrosäule pipettiert. Die Säulen sind mit DEAE - Cellulose, die positiv geladen ist, bepackt. Das negativ geladene ^{14}C -Glucose-6-Phosphat verbindet sich mit der Cellulose. Werden die Säulen mit Salzsäure gewaschen, wird diese Bindung wieder aufgebrochen und das ^{14}C -Glucose-6-Phosphat kann gesammelt und dann als Maß für nicht umgesetztes Substrat bestimmt werden. Läßt man H_2O über die Säulen laufen, wird ^{14}C -Glucose ausgewaschen, diese dient als Maß für das entstandene Produkt.

Mit beiden Methoden kann man auf die Aktivität des Enzyms zurückschließen.

Die Mikrosäule

Materialien:

2ml - Einmalspritze ohne Kolben
Glaswolle
DEAE - Cellulose (Chlorid - Form)
Kunststoffständer
20ml - Vials
Kunststoffträger für Vials
Szintillationsflüssigkeit

Bepacken der Säulen:

Der Boden der Einmalspritzen wird mit einem wassergetränkten Fleckchen Glaswolle bedeckt, damit wird ein Durchlaufen der Cellulose vermieden. Mit einer Pasteur - Pipette beschickt man nun die so präparierten Säulen 1cm hoch mit DEAE - Cellulose, sie hängen dabei in einem entsprechend konstruierten Kunststoffständer. Jetzt wird mit destilliertem Wasser nachgespült, um an der Säulenwand hängengebliebene Cellulose abzuwaschen. Dann wird der Ständer so über einem Träger placiert, daß jeweils eine Säule über einem Vial hängt.

Durchführung einer Messung:

30 bzw. 50µl Überstand der zu messenden Probe werden jeweils vorsichtig auf eine Säule pipettiert. Anschließend werden je 3x2ml H_2O oder je 2x1,5ml HCl (150mM) auf die Säulen gegeben. Wenn die jeweilige Flüssigkeit vollständig über die Säulen gelaufen ist und sich in den Vials gesammelt hat, werden diese mit Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt, mit einem Schraubdeckel verschlossen und von Hand geschüttelt. Die Menge der Szintillationsflüssigkeit wird so gewählt, daß nach dem Schütteln ein transparentes Gemisch entsteht.

Die Restüberstände werden zusammengeschüttet, davon 30 bzw. 50ml direkt in ein Vial pipettiert, mit H_2O bzw. HCl gemischt und ebenfalls mit Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Damit erhält man die 100% - Werte.

Jetzt werden die Vials in den Counter gegeben, der die radioaktiven Impulse zählt und ausdrückt.

Herstellung der Cellulose (Chlorid - Form)

Ausgangssubstanz: DEAE - Cellulose

Diese wird in einem 5l - Becherglas mit Aqua dest. aufgeschwemmt. Nachdem sich der Großteil der festen Bestandteile abgesetzt hat, wird der Überstand abgesaugt. Der Vorgang wird mit NaOH und anschließend wieder mit Aqua dest. wiederholt, bis ein pH - Wert von 9 erreicht ist. Dann wird der gleiche Arbeitsgang mit HCl solange durchgeführt, bis ein pH - Wert von 5 bis 6 erreicht ist.

Die Cellulose liegt dann in Chlorid - Form vor.

Berechnung der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase

Formel für Methode 1:

Aktivität in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe

$$\text{Units} = \frac{\Delta E \times \text{Konz. Standardlsg.} (\mu\text{mol}/\text{ml}) \times \text{Verd.-Faktor}}{\Delta E(\text{Standardlsg}) \times \text{Ink.-Zeit}(\text{min}) \times 0,03 \times \text{g Gewebe}/\text{ml}}$$

Aktivität in $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein

$$\text{Units} = \frac{\Delta E \times \text{Konz. Standardlsg.} (\text{nmol}/\text{ml})}{\Delta E(\text{Standardlsg}) \times \text{Ink.-Zeit}(\text{min}) \times \text{mg Protein}/\text{ml}}$$

Formel für Methode 2:

Aktivität in $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein

$$\text{Units} = \frac{\Delta \text{CPM} (\text{Ansatz 1}) - \text{CPM} (\text{Ansatz 2}) \times \text{Konz. Glu-6-P} (\text{nmol}/\text{ml})}{\text{CPM } 100\% \times \text{Ink.-Zeit} (\text{min}) \times \text{mg Protein}/\text{ml}}$$

ΔE : Extinktionsdifferenz

CPM: Counts per minute

Methode zur Unterscheidung der Glykogenosen Typ Ia und Typ Ib
(33)

Wird die Aktivität der Glu-6-Phase in der oben beschriebenen Weise gemessen (Seite 14), sind durch die Vorbehandlung der Proben die Microsomen bereits zerstört. Der Transportdefekt für Glu-6-P, wie er beim Typ Ib vorliegt, ist deshalb nicht zu erkennen, es werden normale Aktivitäten gemessen (Seite 4). Die Feststellung des Transportdefektes ist dann möglich, wenn die Enzymaktivität bei erhaltenen und zerstörten Microsomenmembranen gemessen werden kann.

Voraussetzung dafür ist die Verwendung von frischen, noch nicht eingefrorenen Gewebeproben, die von Hand homogenisiert werden. Mit Desoxycholat (DOC) kann die Membran für die Vergleichsmessung zerstört werden.

Reagenzien:

Saccharose 0,25 mol/l + EDTA 0,005 mol/l, pH 7,2

Glu-6-P 0,1 mol/l + EDTA 0,002 mol/l, pH 6,5

β -Glycerophosphat 0,1 mol/l + EDTA 0,002 mol/l, pH 6,5

Natriumdesoxyolat 1%ig

Ansatz und Durchführung:

1: 200 μ l Homogenat + 20 μ l DOC 1 und 2 je 30min im Eiswasser-
2: 200 μ l Homogenat + 20 μ l H₂O bad stehenlassen

1a: 30 μ l von Ansatz 1 + 30 μ l Glu-6-P

2a: 30 μ l von Ansatz 2 + 30 μ l Glu-6-P

1b: 30 μ l von Ansatz 1 + 30 μ l β -Glycerophosphat

2b: 30 μ l von Ansatz 2 + 30 μ l β -Glycerophosphat

Jetzt werden die Proben für 60min bei 37°C inkubiert, abgestoppt wird die Reaktion durch 5min Heizen bei 95°C.

Die Ansätze mit β -Glycerophosphat dienen als Leerwerte, es werden dabei die unspezifischen Phosphatasen verbraucht.

Die Werte, die sich aus den Differenzen 2a - 2b errechnen, geben dann die Enzymaktivität bei erhaltener Membran, die aus den Differenzen 1a - 1b bei zerstörter Membran wieder.

Messung der Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase (EC 3.2.1.33)
(Glykogenose Typ III) nach HERS (19)

Testprinzip:

Inkorporation von ^{14}C -Glucose in Glykogen

Proben:

Erythrozyten (eingefroren)

Reagenzien:

Glykogen 20%ig

^{14}C -Glucose (25 bzw. 50 $\mu\text{Ci/ml}$)

Glucose

Ansatz und Durchführung:

100 μl Glykogen 20%ig

50 μl ^{14}C -Glu + Glucose

100 μl Erythrozyten 1:2 verdünnt

Modifikation:

5 μl

10 μl

10 μl

Die Erythrozyten werden aufgetaut und mit Aqua dest. verdünnt. Davon werden je 100 μl in Eppendorf - Reaktionsgefäße (jeweils Duplikat) pipettiert und anschließend mit 150 μl Reaktionsgemisch (^{14}C -Glu + Glu + Glykogen) 3 - 4 Std. bei 37°C inkubiert. Die Leerwerte werden vor Zugabe des Reaktionsgemisches 5min geheizt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt mit 500 μl 25%iger ICA. Anschließend wird eine Glykogenfällung durchgeführt.

Erläuterung:

Die Amylo-1,6-Glucosidase hydrolysiert die α -1,6-glycosidischen Bindungen, dabei entsteht freie Glucose. Bei einem Produktüberangebot läuft diese Reaktion in die umgekehrte Richtung, Glucose wird in das sogenannte Grenzdextrin eingebaut. Verwendet man radioaktiv markierte Glucose, ist die im Grenzdextrin zu findende Aktivität ein Maß für die Enzymaktivität.

Berechnung:

$$\text{Units} = \frac{\Delta\text{CPM} \times \text{Konz. Glucose (nmol/ml)}}{\text{CPM } 100\% \times \text{Ink.-Zeit(min)} \times \text{g Hb/100ml}}$$

Messung der Aktivität der Phosphorylase a und der Phosphorylase a + b (EC 2.4.1.1) (Glykogenose Typ V) nach HERS (19)

Testprinzip:

Inkorporation von ^{14}C -Glu-6-P in Glykogen

Proben:

Erythrozyten (eingefroren)

Reagenzien:

Reaktionsgemisch a:

Glykogen 2%ig

NaF 0,2 M

Coffein 1 mM

^{14}C -Glu-1-P 20 mM (2 $\mu\text{Ci/ml}$)

Reaktionsgemisch a + b:

Glykogen 2%ig

NaF 0,3 M

AMP 3 mM

^{14}C -Glu-1-P 20 mM (2 $\mu\text{Ci/ml}$)

Beide Gemische sind auf einen pH - Wert von 6,1 eingestellt.

Ansatz und Durchführung:

100 μl Reaktionsgemisch

50 μl Erythrozyten 1:3 verdünnt

Die Durchführung ist analog der bei Typ III.

Die Inkubationszeit beträgt vier Stunden.

Abgestoppt wird die Reaktion mit je 500 μl TCA 0,6 M.

In jedes Reaktionsgefäß werden noch zusätzlich 200 μl 10%iges Glykogen pipettiert, anschließend wird eine Glykogenfällung wie bei Typ III durchgeführt.

Erläuterung:

Die Phosphorylase spaltet die 1,4-glycosidischen Bindungen, dabei entsteht Glu-1-P. Wie bei der Methode für Typ III bewirkt ein Produktüberangebot an Glu-1-P eine Umkehrung der Reaktion, Glu-1-P wird in Glykogen eingebaut. Über die dort zu findende Aktivität kann wiederum auf die Enzymaktivität geschlossen werden.

Es existieren zwei Formen der Muskelphosphorylase, die aktive Form a und die inaktive Form b. Die beiden Dimere sind durch das Enzym Phosphorylase-b-Kinase interconvertierbar (33).

Berechnung:

$$\text{Units} = \frac{\Delta \text{CPM} \times \text{Konz. Glucose-1-Phosphat (nmol/ml)}}{\text{CPM 100\%} \times \text{Ink.-Zeit (min)} \times \text{g Hb/100ml}}$$

Glykogenfällung

Materialien:

Reagenzgläser

Reagenzglasständer (im Eiswasserbad)

Plastikspatel

Reagenzien:

TCA 5%ig

Äthanol 96%ig

Na_2SO_4

KOH 10%ig

Durchführung:

Die mit je 500µl TCA abgestoppten Proben werden zentrifugiert und in je ein Reagenzglas pipettiert. Das jeweilige Sediment wird nochmals mit 500µl TCA gut geschüttelt und zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in das entsprechende Reagenzglas gegeben.

Die Überstände werden mit je 3ml Äthanol gemischt und solange geschüttelt, bis Glykogen ausfällt, anschließend wird bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird als radioaktiver Abfall verworfen.

Das Sediment wird jetzt mit 1ml KOH 5min im Wasserbad gekocht, nach dem Abkühlen wird zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen.

Nun wird das Sediment in 2ml H_2O gelöst, 20µl Na_2SO_4 zur Beschleunigung der Fällung zugegeben und mit 5ml Äthanol geschüttelt. Der Überstand wird verworfen.

Abschließend werden die Reagenzgläser für 15min in den Brutschrank gestellt (zur Verdunstung des restlichen Alkohols), dann das Sediment in 2ml H_2O gelöst, in Vials umgefüllt und diese mit je 16ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt und zur Messung in den Counter gegeben.

Diese Methode wurde wie folgt modifiziert:

1. Statt der Zugabe der ersten 3ml Äthanol:
Mischen der Überstände mit 1,5ml H_2O und Lösen in 6ml Äthanol
2. Der Schritt des Kochens mit KOH wurde weggelassen
3. Die zweite Fällung wurde statt mit 5ml ebenfalls mit 6ml Äthanol durchgeführt

Später wurde die Methode noch so weiterverändert, daß nur noch zwei Fällungen mit je 4ml H_2O und mit 8ml Äthanol durchgeführt wurden, ohne Na_2SO_4 zuzugeben.

4. Jeweils nach dem Abkippen der Überstände wurden die Reagenzgläser für einige Minuten umgekehrt in Ständer gestellt, um den Alkohol gründlicher zu entfernen

Zum Vergleich der beiden Methoden wurde die Amylo-1,6-Glucosidase in den Erythrozyten einer gesunden Kontrollperson bestimmt.

Alte Methode:

339 - 449

Modifizierte Methode:

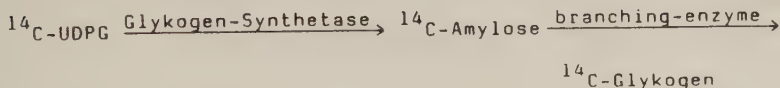
323 - 475 CPM (Counts per minute)

Eine andere Methode zur Glykogenreinigung mit Hilfe von Filterpapier (46) erwies sich als weniger zweckmäßig als die oben beschriebene.

Zur Messung der Aktivität der Glykogen-Synthetase ist auch der Schritt der Glykogenreinigung notwendig. Ein Versuch, statt dessen das Zwischenprodukt Amylose (Seite 23), ebenfalls mit Äthanol, auszufällen, zeigte, daß die Fällung der Amylose wesentlich schlechter gelingt.

Messung der Aktivität der Glykogen-Synthetase (UDPG-Transferase)
(EC 2.4.1.11) nach TAMURA et al (43)

Testprinzip:



Proben:

Homogenat, Erythrozyten

Reagenzien:

Tris-Puffer	50mM, pH 7,5
EDTA	2mM
NaF	62,5mM
Glykogen	10mg/ml
Glucose-6-Phosphat	0,1mM und 10mM
UDPG	1mM
$^{14}\text{C-UDPG}$	

Ansatz und Durchführung:

Leber - Homogenat (1:6 verdünnt):

50µl Probe + 100µl Gemisch, Inkubationszeit 1Std

Erythrozyten (konzentriert):

50µl Probe + 100µl Gemisch, Inkubationszeit 2-4Std

Abstoppen und Glykogenfällung wie bei Typ III, zusätzliche Anreicherung jeder Probe mit 100µl 10%igem Glykogen.

Erläuterung:

Enthält das Reaktionsgemisch NaF, wird das Enzym spezifisch zerstört. Die Differenz der dabei entstehenden Produktmenge zu der, die unter optimalen Bedingungen entsteht, ist ein Maß für die Aktivität des Enzyms.

Die Glykogen-Synthetase ist ein interconvertierbares Enzym, dessen Aktivität unter anderem von der Konzentration des Glucose-6-Phosphats abhängt.

Quantitative Bestimmung des Glykogens (40)

Testprinzip:

Hydrolysierung der 1,6-glycosidischen Bindungen durch Amylo-Glucosidase, es entsteht freie Glucose

Proben:

Erythrozyten

Reagenzien:

Amylo-Glucosidase

NaAc-Puffer 0,1M, pH 4,8

Durchführung:

In einem Eppendorf - Reaktionsgefäß wird H_2O auf $95^{\circ}C$ aufgeheizt. 50µl Erythrozyten werden mit 100µl dieses kochenden Wassers gemischt und 5min weitergekocht.

Danach Abkühlen und Zentrifugieren der Proben.

30µl Überstand (Duplikat) werden in Eppendorf - Reaktionsgefäße im Eiswasserbad pipettiert und mit je 30µl NaAc-Puffer gemischt. Mit einer Mikropipette werden nun je 2µl Amylo-Glucosidase zugegeben, die Reaktionsgefäße geschüttelt und 90min bei $37^{\circ}C$ inkubiert.

Die Reaktion wird durch 5min Heizen bei $95^{\circ}C$ gestoppt.

In den Überständen (je 20µl + Duplikat) wird die Glucose gemessen (Seite 25).

Berechnung des Glykogengehalts:

$$\frac{\Delta E \times \text{Standardlsg (mg\%)} \times \text{Verd.-Faktor}}{\Delta E \text{ (Standardlsg)}} =$$

= Glykogengehalt in mg/100ml Erythrozyten

Glucosemessung

Testprinzip:



Reagenzien:

Triäthanolaminpuffer + MgSO ₄ , pH 7,4	200µl
ATP 15mM	20µl
NADP 12mM	20µl
Hexokinase + Glu-6-P-Dehydrogenase 125U/l	2µl

Durchführung:

Es werden je 20µl Überstand der zu messenden Probe in ein Eppendorf - Reaktionsgefäß pipettiert (Duplikat) und die Reagenzien in der oben genannten Reihenfolge zugegeben. Beim Pipettieren Enzyms wird das Gefäß geschüttelt. Nach 15min wird die Extinktion bei 334nm gegen den Nullpunkt Luft abgelesen.

Mikromethode zur Proteinbestimmung nach LOWRY (30)

Testprinzip:

Proteine geben in alkalischer Lösung mit Kupferionen einen blauen Farbkomplex

Reagenzien:

Lösung A: Na_2CO_3 (2%ig, wasserfrei) in n/10 NaOH

Lösung B_a: CuSO_4 5,5 g/100ml

Lösung B_b: Seignettesalz (Na-K-Tartrat) 1,35 g/100ml

Folin Ciocalteus Phenolreagenz

Na_2CO_3 2%ig

Gemische: (bei jeder Bestimmung neu anzusetzen)

I. 0,2ml B _b	II. 5,0ml A
0,02ml B _a	0,1ml B
0,22ml B	5,1ml C

Als Standard wird Rinderalbumin (5mg/ml) verwendet.

Dieses wird für den Test verdünnt auf:

1,0 0,5 0,25 0,1 0,05 0,025 mg/ml

Durchführung:

20µl Homogenat (zentrifugierter Überstand) werden in ein Eppendorf - Reaktionsgefäß pipettiert (Duplikat). Dazu werden je 200µl der Lösung C gegeben und die Proben dann 10min bei Raumtemperatur stehengelassen.

Danach werden unter sorgfältigem Schütteln je 20µl Folin Ciocalteus Phenolreagenz (1:2 verdünnt mit Na_2CO_3) pipettiert und anschließend die Reaktionsgefäße unter Lichtabschluß 30-35min aufbewahrt.

Die Leerwerte ergeben sich aus gleichbehandelten Ansätzen mit H_2O . Die Extinktion wird bei 772nm gegen den Leerwert abgelesen. Die Proteinwerte sind aus der Standardkurve zu ermitteln.

Da die Eichkurve nur im unteren Drittel linear verläuft (0,1-0,2mg/ml), ist das Homogenat entsprechend zu verdünnen.

Hämoglobinbestimmung

Testprinzip:

Hämoglobin wird durch Kaliumferricyanid zu Hämglobin oxydiert. Hämglobin reagiert mit Kaliumcyanid zu Hämglobincyanid, welches photometrisch gemessen werden kann.

Reagenzien:

Transformationslösung: Kaliumcyanid
Kaliumferricyanid
Natriumbicarbonat

Durchführung:

0,02ml Probe (Erythrozyten) werden mit 5ml Transformationslösung gemischt. Nach 15min wird die Extinktion bei 546nm abgelesen. Nullpunkt ist die Extinktion der Transformationslösung.

Berechnung:

$$\Delta E \times 36,8 = \text{mg Hb/ml}$$

2.2.3 Das Prinzip der Enzymkinetik

Enzyme wirken unter den Bedingungen, wie sie in der lebenden Zelle herrschen, als Katalysatoren, indem sie den Ablauf spontaner Substratumsetzungen beträchtlich beschleunigen.

Die zur Überführung des Substrats in den reaktiven Zustand nötige Aktivierungsenergie wird durch Enzyme gesenkt.

Am Enzym entsteht ein Enzym-Substrat-Komplex, der sich in der Reaktion zum Enzym-Produkt-Komplex umlagert und rasch zum Enzym und freien Produkt zerfällt.

Die Anfangsgeschwindigkeit v einer enzymkatalysierten Reaktion ist bei Substratüberschuß direkt proportional der Enzymkonzentration E :



Die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht dann einen Maximalwert V der nicht überschritten werden kann, das Enzymmolekül ist mit Substrat gesättigt.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration im Diagramm:

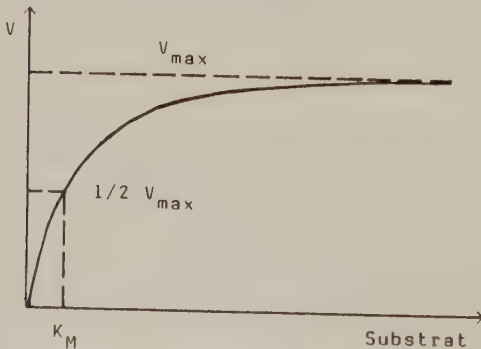


Abb.3

Die Substratkonzentration, die die halbmaximale Geschwindigkeit bewirkt, wird als K_M oder als Michaeliskonstante bezeichnet.

Die Michaelis-Menten-Gleichung lautet:

$$v = \frac{V [S]}{K_M + [S]}$$

v : Reaktionsgeschwindigkeit

V : maximale Geschwindigkeit

$[S]$: Substratkonzentration

Diese Gleichung beschreibt das Aktivitätsverhalten der Enzyme bei Änderung der Substratkonzentrationen.

Ist $[S]$ sehr viel kleiner als K_M , dann ist $[S]$ vernachlässigbar.

Die Gleichung lautet dann:

$$v \approx \frac{V [S]}{K_M} ; \text{ in diesem Fall ist } v \text{ von } [S] \text{ abhängig.}$$

Ist S sehr viel größer als K_M , dann ist K_M vernachlässigbar.

Die Gleichung lautet dann:

$$v \approx \frac{V [S]}{[S]} ; v \text{ ist dann gleich } V_{\max}.$$

Wenn $[S]$ gleich K_M ist, lautet die Gleichung:

$v = \frac{V [S]}{[S] + [S]} = \frac{V}{2}$; ist also die Substratkonzentration gleich dem K_M -Wert, dann ist die gemessene Geschwindigkeit v gleich der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit.

Um eine einfachere graphische Darstellung zu erreichen, wird die Michaelis-Menten-Gleichung wie folgt umgewandelt:

$$v = \frac{V [S]}{K_M + [S]} ; \frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V [S]} ; \frac{1}{v} = \frac{K_M}{V} \times \frac{1}{[S]} + \frac{[S]}{V [S]} ;$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} ; \text{ in dieser Form entspricht die Gleichung der Geradengleichung } y=ax+b.$$

Die Steigung der Geraden entspricht dabei dem Ausdruck K_M/V .

Das entsprechende Diagramm ist nach LINEWEAVER und BURK benannt:

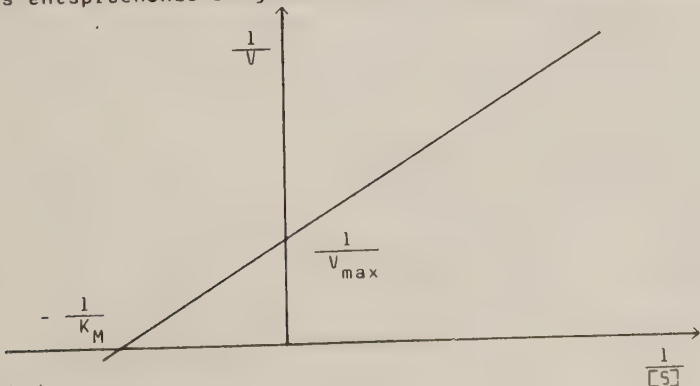


Abb. 4

3. Ergebnisse

3.1 Glykogenose Typ I

Feststellung der optimalen Inkubationszeiten bei Messung der Glucose-6-Phosphatase

Versuch 1 (Abb.5, Seite 31)

Die Denaturierungszeit für den Ansatz 2 (Homogenat + Na-Ac-Puffer betrug 5, 10 und 15 Minuten, die für den Ansatz 1 gleichbleibend 5 Minuten. Die Zeit für den Reaktionsablauf blieb, ebenfalls unverändert, bei 60 Minuten.

Ergebnis ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe):

Denaturierungszeit	Werte
5 Minuten	0,38
10 Minuten	0,39
15 Minuten	0,39

Die Werte zeigen, daß 5 Minuten zur Denaturierung ausreichen. Die insgesamt niedrigen Werte erklären sich dadurch, daß das Gewebe nach dem Homogenisieren nochmals eingefroren war und sich deshalb die Enzymaktivität verringerte.

Versuch 2 (Abb.6, Seite 31)

Die Inkubationszeiten für Ansatz 1 (Homogenat + H_2O) und die Denaturierungszeiten für Ansatz 2 (Homogenat + Puffer) wurden zwischen 5 und 10 Minuten verändert, diejenigen für den Reaktionsablauf betragen eine, 2 und 3 Stunden.

Ergebnis ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe)

Inkubationszeit	5 Minuten	10 Minuten
1 Stunde	3,6	3,3
2 Stunden	3,4	3,0
3 Stunden	2,4	1,6

Dieser Versuch zeigt, daß auch für den Ansatz 1 eine Inkubationszeit von 5 Minuten ausreicht und es nicht sinnvoll ist, die Reaktion länger als 2 Stunden laufen zu lassen, da bei dreistündiger Inkubation die Werte wieder absinken.

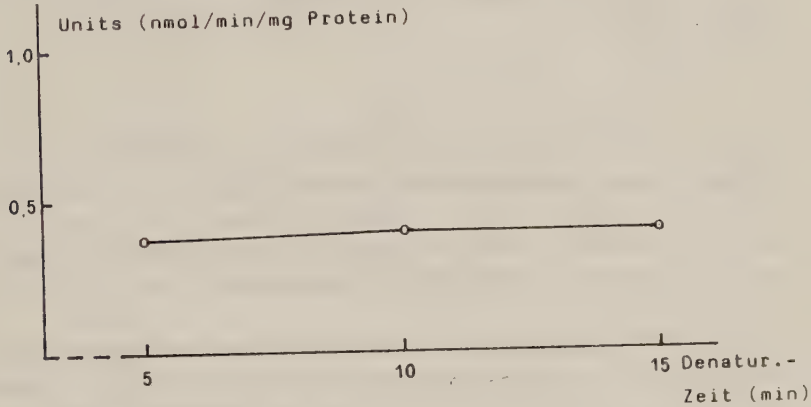


Abb. 5: Zerstörung der unspezifischen Phosphatasen

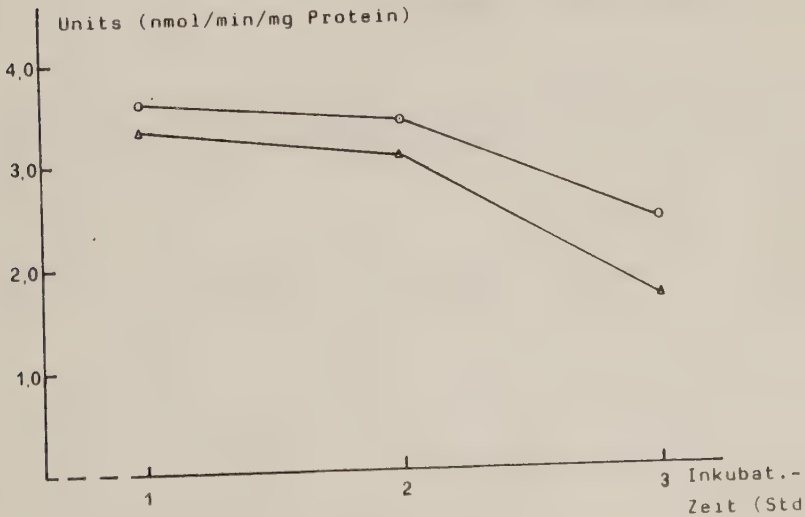


Abb. 6: Enzymatische Reaktion

Versuch 3

Ansatz 1 wurde nicht, Ansatz 2 5 Minuten inkubiert.

Die Reaktionszeit betrug eine und 2 Stunden.

Ergebnis ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe)

Inkubationszeit

1 Stunde 4,8

2 Stunden 3,5

Es ist also nicht notwendig, bei Ansatz 1 zu inkubieren, da die Werte denen bei Inkubation (Versuch 2, Seite 30) entsprechen.

Bei den Versuchen wurde Lebergewebe verwendet, die Phosphatmessungen wurden photometrisch durchgeführt.

Ein weiterer Versuch zeigte, daß bereits homogenisiertes Lebergewebe nach dreimaligem Wiederauftauen keine Enzymaktivität mehr aufweist, die auch schon nach einmaligem Wiederauftauen, wie Versuch 1 zeigt, stark absinkt.

Das bedeutet, daß für Untersuchungen immer frisch homogenisiertes Gewebe verwendet werden muß.

Tab.2 Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in Lebergewebe,
spektrophotometrische Messung (Seite 13)

Nummer der Probe	Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (nmol/min/mg Protein)
1	3,5
4	2,8
5	3,3

Diese Werte sind etwas niedriger als diejenigen, die im gleichen Labor bei Verwendung frischen Biopsie-Gewebes gemessen wurden. Hier wurde bereits eingefrorenes, 8-24 Stunden post mortem entnommenes, Autopsie-Gewebe verwendet.

Spektrophotometrische Messung der Aktivität in biotisch gewonnenem Lebergewebe eines Patienten (Nr.41) mit Glykogenose Typ I:
1,4 nmol/min/mg Protein

Tab.3 Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in Lebergewebe,
Messung der Radioaktivität (Seite 15)

Nummer der Probe	Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (nmol/min/mg Protein)
1	0,9
2	0,9
3	1,3

Tab.4 Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in Leukozyten,
Messung der Radioaktivität (Seite 15)

Nummer der Probe	Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (nmol/min/mg Protein)
1	2,5
2	5,5
3	4,0
4	2,3
5	2,5
6	1,4
7	1,3
8	1,5
Mittelwert	2,625
Standardabweichung	1,45
Bereich	1,3 - 5,5

Aktivität des Enzyms bei einer Patientin (Nr.7) mit Glykogenose Typ I: 0,8 nmol/min/mg Protein

Da bei diesen Messungen häufig keine Differenzen zwischen den Werten des Ansatzes 1 und denen des Ansatzes 2 auftraten, ist anzunehmen, daß hier auch unspezifische Phosphatasen mitgemessen wurden.

Bei dem Versuch, durch die spektrophotometrische Messung der Glucose-6-Phosphatase in Lebergewebe die Glykogenosen Typ Ia und Typ Ib (Seite 18) zu unterscheiden, wäre zu erwarten gewesen, daß die Ergebnisse bei der Messung der Aktivität des Enzyms bei zerstörter Membran denen bei intakter entsprechen (bei Verwendung frischen Gewebes). Die Meßwerte bestätigten dies nicht. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß trotz des schonenden Vorgehens auch beim Ansatz 2 die Membranen kaputtgegangen sind. Diese Versuche haben aber gezeigt, daß erhebliche Aktivitätsunterschiede zwischen frisch verarbeitetem und vor den Messungen eingefrorenem Gewebe oder Homogenat bestehen. Die höchsten Enzymaktivitäten wurden in den Homogenaten aus frischem, noch nicht eingefroren gewesenen Gewebe gemessen. Die höheren Aktivitäten erklären sich dadurch, daß sich durch den Vorgang des Einfrierens und Auftauens zusätzliches Protein aus den Zellmembranen löst und somit das Verhältnis von Aktivität zu Proteinmenge verringert wird.

Stabilität der Glucose-6-Phosphatase

Das Enzym wurde in einer Konzentration von 5mg/ml H₂O verwendet. Die Enzymlösung wurde frisch und nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen getestet.

Häufigkeit des Einfrierens	Aktivität der Glucose-6-Phosphatase (nmol/min/mg Protein)
frisch	6,7 - 8,2
1mal	4,0 - 5,3
2mal	1,8 - 3,7
3mal	0,8 - 0,9

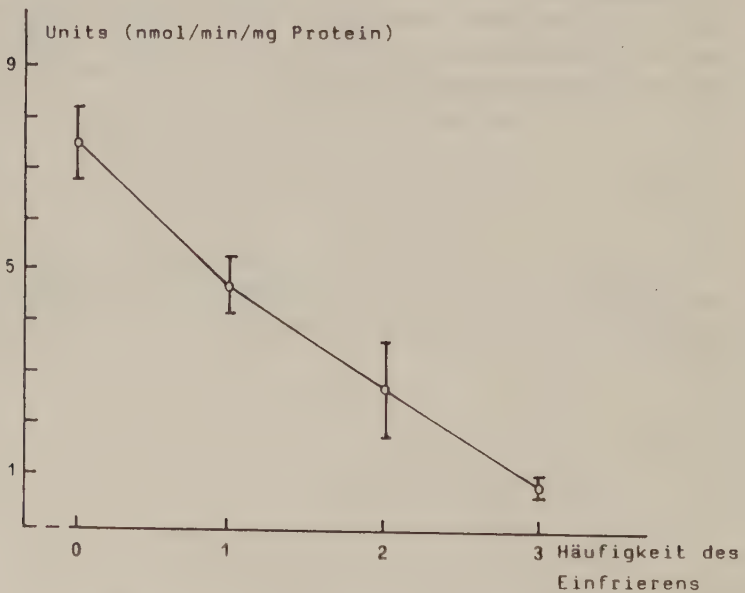


Abb.5 Stabilität der Glucose-6-Phosphatase in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Einfrierens

pH-Optimum für die Glucose-6-Phosphatase

Die Wirkung des Enzyms erfolgt in einem relativ breitem pH-Optimum mit einem Maximum bei pH 6,3 (Abb. 6).

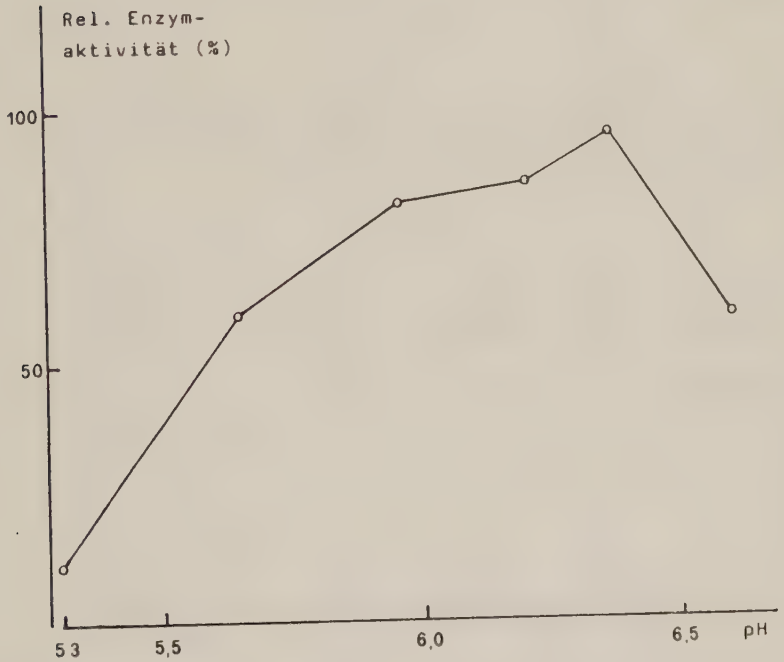


Abb.6 pH-Optimum der Glucose-6-Phosphatase

Kinetikstudien

Tab.5 Michaeliskonstante K_M der Glucose-6-Phosphatase

Gewebe	Nummer der Probe	K_M (mmol/l) für Glu-6-Phosphat
Leber	1	13,0 - 18,0
	2	8,0 - 13,3
	2	10,0 - 12,0
	3	12,0 - 18,0
	Bereich	8,0 - 18,0
Niere	1	7,5 - 10,0
	2	7,5 - 8,3
	2	10,0 - 11,4
	2	15,0 - 20,0
	Bereich	7,5 - 20,0
Leukozyten	5	8,0 - 20,0
	9	7,3 - 16,7
	10	8,5 - 20,0
	11	6,7 - 17,4
	41	11,0 - 20,0
	43	7,7 - 20,0
	46	7,3 - 13,3
	Bereich	6,7 - 20,0

Die Werte für Leber und Niere Nr.1 wurden mit der spektrophotometrischen Methode, alle anderen über die Messung der Radioaktivität bestimmt. K_M wurde jeweils anhand eines Diagramms nach LINEWEAVER und BURK ermittelt (Abb.4, Seite 29). Die Konzentrationen des Substrats Glucose-6-Phosphat betrugen 10, 20, 50 und 100mmol/l. Beispiele: Abb.7 und 8, Seiten 42 und 43.

Da erst bei einer Substratkonzentration, die 100mal höher als der K_M -Wert ist, davon ausgegangen werden darf, daß das Enzym mit Substrat gesättigt ist (17), würde die Enzymkatalyse der Glucose-6-Phosphatase erst bei erheblich höheren Substratkonzentrationen als den hier verwendeten mit maximaler Geschwindigkeit ablaufen.

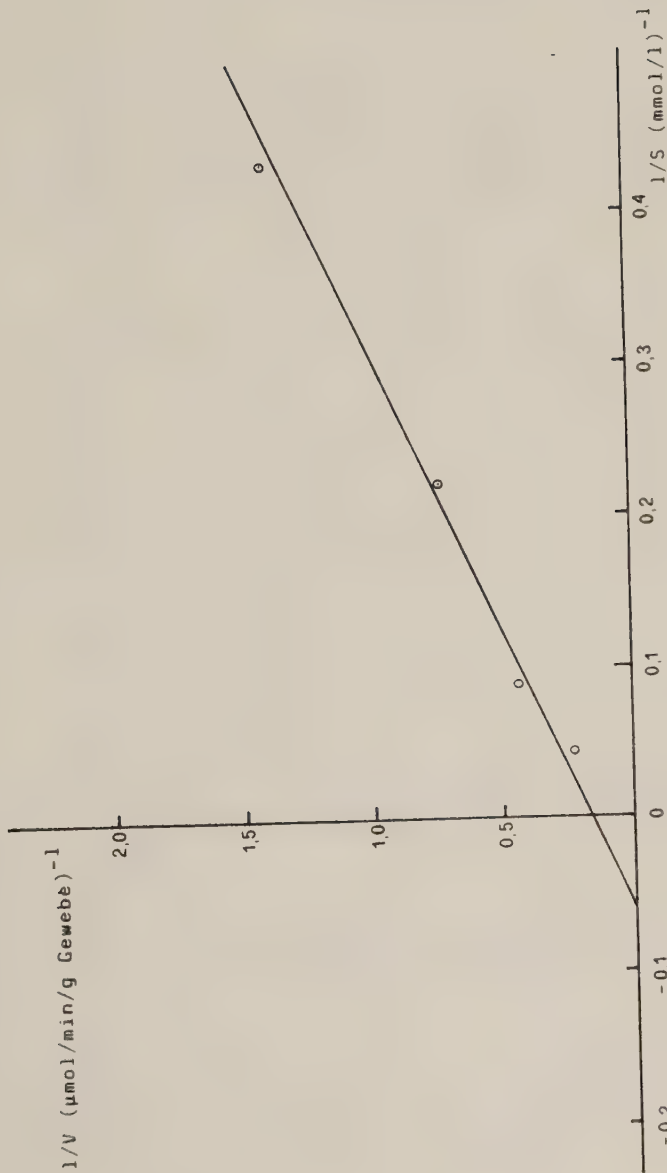


Abb. 7 LINEWEAVER-BURK-Diagramm: Leber Nr.1

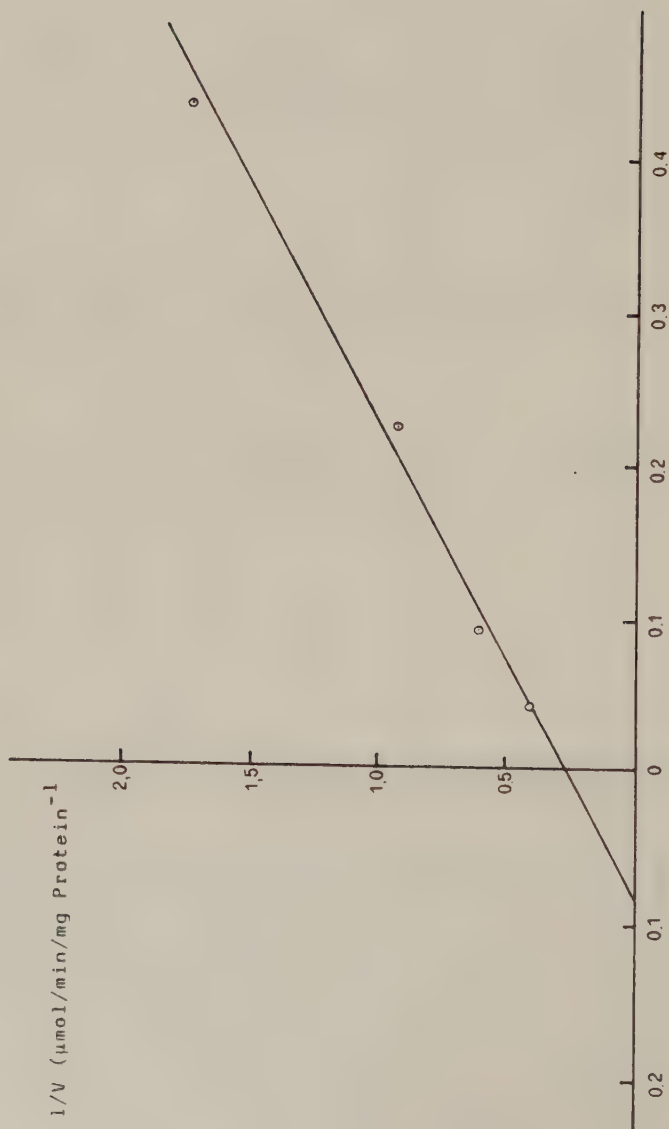


Abb. 8 LINEWEAVER-BURK-Diagramm: Leukozyten Nr. 11

3.2 Glykogenosen Typ III,V,VIa und Glykogensynthesestörung

Tab.6 Glykogengehalt und Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase in Erythrozyten (Methoden Seiten 19 und 24)

Typ der Glykogenose	Pat. Nr.	Glykogengehalt ($\mu\text{g/g Hb}$)	Aktivität der Amylo-1,6-glucosidase (nmol/min/g Hb)
Typ I	7	277,8	-
	14	209,6	0,6
	15	290,2	0,9
	23	247,0	2,3
Typ III	3	48.661	0,14
	6	2.967	0
	16	7.386	0
	19	16.868	0
	24	16.250	0
Typ VIa	2	52.328	6,9
	2	32.931	4,8
	4	-	10,0
	4	20.500	5,2
	12	-	4,5
	39	12.857	12,0
Kontrolle (n=10)			
Mittelwert		220,2	2,59
Standardabweichung		98,8	0,72
Bereich		54-362	1,5-3,8
Literatur (22)			
Mittelwert		103	2,33
Standardabweichung			0,2
Bereich		43-204	

Tab.7 Aktivität der Phosphorylase-b-Kinase in Erythrozyten

Pat.-Nr.	Aktivität der Phosphorylase-b-Kinase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$)
2	5,0
2	5,0
4	6,5
4	7,0
12	10,0
Kontrolle (n=13)	
Mittelwert	123,0
Standardabweichung	54,3

Tab.8 Aktivität der Phosphorylase a und a+b in Erythrozyten
(Methode Seite 20)

Typ der Glykogenose	Pat. Nr.	Aktivität der Phosphorylase (nmol/min/g Hb)	
		a	a+b
Typ I	14	3,0	5,7
	15	2,8	5,7
	7	6,3	11,7
Typ II	17	4,1	18,3
Typ III	3	5,7	8,3
	16	5,4	11,6
Typ VIa	4	0,8	2,7
	2	3,0	6,6
	12	3,0	10,0
Kontrolle (n=7)			
Mittelwert		2,27	4,3
Standardabweichung		1,8	3,4
Bereich		0,8-6,2	2,3-12

Tab.9 Aktivität der Glykogen-Synthetase in Erythrozyten
(Methode Seite 23)

Typ der Glykogenose	Pat. Nr.	Aktivität der Glykogen-Synthetase (nmol/min/g Hb)
Typ IV	1	10,2
Typ III	3	10,8
	6	9,7
Typ II	17	5,7
Kontrolle (n=4)		
Mittelwert		8,3
Standarabweichung		6,3
Bereich		1,5-16,1

Probennummern

Gewebe:

1,2,3,4,5: Leber- und Nierengewebe verstorbener Erwachsener
(siehe Seite 11)

Blutbestandteile:

1,2,3,4,41,43,46: Leukozytenpräparate erwachsener Kontroll-
personen

Patientennummern:

Nummer	Alter(Jahre)	Geschlecht	Diagnose
1	2	weiblich	Typ IV
2	3	männlich	Typ VIa
3	2	männlich	Typ III
4	7	männlich	Typ VIa
6	2	männlich	Typ III
7	14	weiblich	Typ I
12	13	männlich	Typ VIa
14	10	weiblich	Typ I
15	4	männlich	Typ I
16	9	weiblich	Typ III
17	Säugling	weiblich	Typ II
23	1	weiblich	Typ I
24	2	weiblich	Typ III
39	7	männlich	Typ VIa

Diskussion

Bei den vergleichenden Messungen der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in Lebergewebe zeigte sich, daß die mit Hilfe der radioaktiven Methode gewonnenen Meßwerte niedriger liegen als die durch spektrophotometrische Messung erhaltenen. Die Ursache dafür liegt in den verwendeten niedrigen Substratkonzentrationen.

Eine Anwendung der spektrophotometrischen Methode auf Leukozyten ist wegen der im Gegensatz zu Lebergewebe geringen Enzymkonzentrationen nicht möglich. Mit Hilfe der radioaktiven Methode ist die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in Leukozyten jedoch meßbar.

Allerdings sind die Ergebnisse schlecht reproduzierbar.

Häufig entsprachen die Werte aus dem Meßansatz 1, bei dem alle in der Probe vorhandenen Phosphatasen gemessen werden, denen aus dem Meßansatz 2, bei dem die unspezifischen Phosphatasen zerstört werden sollten.

Diese Beobachtung spricht dafür, daß es in diesen Fällen nicht gelang, mit der angewandten Methode die unspezifischen Phosphatasen zu zerstören.

Es bedeutet außerdem, daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß bei den Versuchen mit Leukozyten, bei denen Differenzen zwischen den Werten aus den beiden Meßansätzen auftraten, nicht nur die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase, sondern auch die Aktivitäten unspezifischer Phosphatasen mitgemessen wurden.

Das bedeutet, daß für die sichere Zerstörung der unspezifischen Phosphatasen in den entsprechenden Leukozytenpräparaten noch eine adäquate Methode entwickelt werden muß.

Einige Messungen können auch so gedeutet werden, daß bei der Aufbereitung des Materials beziehungsweise beim Meßvorgang selbst das Enzym vor der Messung inaktiviert wurde. Ein möglichst schonendes Vorgehen ist deshalb erforderlich.

Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel, zur Zerstörung der Zellen nicht den Einfrier/Auftau - Vorgang zu verwenden, sondern die Proben zu sonifizieren.

Wird als Untersuchungsmaterial Gewebe verwendet, empfiehlt es sich, dieses nicht einzufrieren und per Hand zu homogenisieren. Weiterhin könnte der Versuch unternommen werden, die Glucose-6-Phosphatase mit Hilfe der radioaktiven Methode in anderen Blutbestandteilen, zum Beispiel in Thrombozyten, zu messen.

Da es gelungen ist, die Glucose-6-Phosphatase in Amnionzellen und Fibroblasten zu messen, kann daran gedacht werden, bei entsprechender Verfeinerung und Standardisierung der Methode, bei entsprechendem Krankheitsverdacht über eine Amniozentese Zellen zu gewinnen und damit eine pränatale Diagnostik zu betreiben. Bei der Messung des Glykogengehalts in Erythrozyten bei Patienten mit Glykogenose Typ I wurden Normalwerte gefunden. Diese Messung liefert also keine Information, wenn der Verdacht auf diese Speicherkrankheit besteht.

Im Gegensatz dazu ist der Glykogengehalt in den Erythrozyten von Patienten mit einer Glykogenose Typ III deutlich erhöht. Zusammen mit der erniedrigten Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase (ebenfalls in den Erythrozyten) ist damit die Glykogenose Typ III ausreichend sicher diagnostizierbar. Da die Glykogenreinigung vereinfacht werden konnte, ist diese Untersuchung auch schnell durchführbar.

Die Diagnose der Glykogenose Typ VIa wird dadurch erschwert, daß klinisch keine Unterschiede zum Typ VI (HERS) bestehen. Der Glykogengehalt in den Erythrozyten ist stark erhöht, die Aktivität der Phosphorylase-b-kinase erniedrigt.

Als zusätzliches diagnostisches Kriterium kann nun die signifikant erhöhte Aktivität der Amylo-1,6-Glucosidase (Typ III - Enzym) in den Erythrozyten verwendet werden, insbesondere auch zur Abgrenzung vom Typ III, da der bei beiden erhöhte Glykogengehalt keine Unterscheidungsmöglichkeit bietet.

Die Aktivität der Phosphorylase a und Phosphorylase a+b (Typ V - Enzyme) ist für die Diagnose der übrigen Glykogenosen kein Kriterium, da jeweils größenordnungsmaÙig ähnliche Werte gemessen werden. Es ist aber vielleicht möglich, die Aktivität verschiedener Isoenzyme zu messen, bei denen eventuell Aktivitätsunterschiede vorhanden sind. Das gleiche gilt für die Glykogen-Synthetase.

Zur Diagnose der Glykogensynthesestörung aufgrund des Glykogen-Synthetase-Mangels muß die Methode noch weiterentwickelt werden. Bei der Messung von Enzymaktivitäten ist außerdem generell zu beachten, daß es physiologische Enzymreifungsverzögerungen gibt (zum Beispiel die verminderte Aktivität der Glukuronyltransferase beim physiologischen Neugeborenenikterus), die mit einer genetischen Anomalie verwechselt werden können.

Aufgrund einer vereinfachten und verbesserten Möglichkeit der Differentialdiagnose der Glykogenosen mit dem Fernziel einer pränatalen Diagnostik stellt sich die Frage der kausalen Therapie, abgesehen von der Indikation zum Schwangerschaftsabbruch bei besonders schweren Fällen.

Prinzipiell in Frage käme die Substitution des betroffenen Enzyms. Eine erhebliche Schwierigkeit ergibt sich dabei allein schon dadurch, daß schon die physiologischen Konzentrationen der Enzymmengen sehr niedrig sind und somit eine Steuerbarkeit der Zufuhr kaum vorstellbar ist.

Da als Ursache der Defekte Genmutationen diskutiert werden, wäre eine weitere Möglichkeit, als Zukunftsvision, mit "genetic-engineering" Rückmutationen zu veranlassen oder das defekte Gen komplett auszutauschen.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AMP	=	Adenosinmonophosphat
ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adosintriphosphat
DEAE	=	Diäthylaminoäthyl
EDTA	=	Äthylendiamintetraacetat
Glu	=	Glucose
Glu-1-P	=	Glucose-1-Phosphat
Glu-6-P	=	Glucose-6-Phosphat
Glu-6-Phase	=	Glucose-6-Phosphatase
K_M	=	Michaelis - Menten - Konstante (mol/l)
NADP	=	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
TCA	=	Trichloressigsäure
Iris	=	Iris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	=	Unit
UTP	=	Uridin-Triphosphat
UDPG	=	Uridin-Diphosphat-Glucose

Literaturverzeichnis

1. Andersen DH: Familial Cirrhosis of the Liver with Storage of abnormal Glycogen.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 11 (1956)
2. Bannash P, Mayer D, Hacker HJ: Hepatocellular Glycogenosis and Hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 605, 217 - 245 (1980)
3. Bashan N, Jancu C, Lerner A, Fraser D, Potashnik R, Moses SW: Glycogenosis Due to Liver and Muscle Phosphorylase Kinase Deficiency.
Pediat. Res. 15, 299 - 303 (1981)
4. Beratis NG, La Badie G, Hirschhorn K: Genetic Heterogeneity in Acid-glucosidase Deficiency.
Am. J. Hum. Genet. 35, 21 - 33 (1983)
5. Brown DH, Brown BJ: Studies of the residual Glycogen Branching Enzyme Activity present in Human Skin Fibroblasts from Patients with Type IV Glycogen Storage Disease.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 636 - 643 (1983)
6. Chen YT, Cornblath M, Sidbury JB: Cornstarch Therapy in Type I Glycogen Storage Disease.
N. Engl. J. Med. 3, 171 - 174 (1980)
7. Corbeel L, Hue L, Lederer B, De Barsy I, van den Berghe I, Devlieger H, Jaeken J, Bracke P, Eeckels R: Clinical and Biochemical Findings Before and after Portocaval Shunt in a Girl with Type I Glycogen Storage Disease.
Pediat. Res. 15, 58 - 61 (1981)
8. Cori GT, Cori CF: Glucose-6-Phosphatase of the Liver in Glycogen Storage Disease.
J. Biol. Chem. 199, 661 - 667 (1952)

9. Daegelen D, Munnich A, Levin MJ, Girault A, Coasguen J, Kahn A, Dreyfus JC: Absence of Functional Messenger RNA for Glycogen Phosphorylase in the Muscle of two Patients with Mc Ardle's Disease.
Ann. Hum. Genet. 47, 107 - 115 (1983)
10. Forbes GB: Glycogen Storage Disease.
J. Pediatr. 42, 645 (1953)
11. Garibaldi LR: Pathogenesis of Glycogen Storage Disease Type Ib.
J. Pediatr. 98, 669 - 670 (1981)
12. Gahr M, Heyne K: Impaired Metabolic Function of Polymorphonuclear Leucocytes in Glycogen Storage Disease Ib.
Eur. J. Pediatr. 140, 329 - 330 (1983)
13. Von Gierke E: Glykogenspeicherkrankheit der Leber und der Nieren.
Pathol. Anat. 82, 497 - 513 (1929)
14. Greene HL, Slonim AE, Burr IM: Type I Glycogen Storage Disease: A Metabolic Basis for Advances in Treatment.
Adv. Pediatr. 26, 63 - 92 (1979)
15. Greene HL, Slonim AE, Burr IM: Type I Glycogen Storage Disease: Five Years of Management with nocturnal intragastric Feeding.
J. Pediatr. 96, 590 - 595 (1980)
16. Gröbe H, Ullrich K: Glycogen Storage Disease Type I. Results of Treatment with frequent daytime Feeding, combined with nocturnal intragastric Feeding and with administration of an α -Glucosidase Inhibitor.
Eur. J. Pediatr. 140, 102 - 104 (1983)
17. Harper HA, Löffler G, Petrides PE, Weiss L: Physiologische Chemie.
Springer, Berlin Heidelberg New York, 1979

18. Hers HG: The Control of Glycogen Metabolism in the Liver.
Ann. Rev. Biochem. 45, 167 - 189 (1976)
19. Hers HG: Glycogen Storage Disease.
Adv. Metab. Dis. 1, 1 - 44 (1964)
20. Hers HG, van Hoof F: Enzymes of Glycogen Degradation in
Biopsy Material.
Methods in Enzymologie 10, 525 - 532 (1966)
21. Hers HG: Etudes enzymatiques sur Fragments Hépatiques.
Application à la Classification des Glycogénoses.
Rev. Int. Hépat. 9, 35 (1959)
22. Van Hoof F: Amylo-1,6-Glucosidase Activity and Glycogen
Content of the Erythrocytes of Normal Subjects, Patients
with Glycogen Storage Disease and Heterozygotes.
Eur. J. Biochem. 2, 271 - 274 (1967)
23. Huijing F: Phosphorylasekinase in Leukocytes of Normal
Subjects and of Patients with Glycogen Storage Disease.
Biochim. Biophys. Acta 148, 601 - 603 (1967)
24. Igarashi Y, Kato S, Narisawa K, Tada K: A direct Evidence
for Defect in Glucose-6-Phosphate Transport System in He-
patic Microsomal Membrane of Glycogen Storage Disease
Type Ib.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 593 - 597 (1984)
25. Illingworth B, Cori GI, Cori CF: Amylo-1,6-Glucosidase
in Muscle Tissue in generalized Glycogen Storage Disease.
J. Biol. Chem. 218, 123 - 129 (1956)
26. Kalhon SC, Gilfillan C, Tserng KY, Sarin SM: Glucose Pro-
duction in Type I Glycogen Storage Disease.
J. Pediatr. 101, 159 - 160 (1982)
27. Kao KJ, Coleman RA, Pizzo SV: The Bleeding Diathesis in
Human Glycogen Storage Disease Type I. In vitro Identifi-
cation of naturally occurring Inhibitor of Ristocetin-
induced Platelet Aggregation.
Thromb. Res. 18, 683 - 692 (1980)

28. Lange AJ, Arion WJ, Beaudet AL: Type Ib Glycogen Storage Disease Is caused by a Defect in the Glucose-6-Phosphate Translocase of the Microsomal Glucose-6-Phosphatase System. *J. Biol. Chem.* 255, 8381 - 8384 (1980)
29. Lewis GM, Spencer-Peet J, Stewart KM: Infantile Hypoglycaemia due to Inherited Deficiency of Glycogen-Synthetase in Liver. *Arch. Dis. Child.* 38, 40 - 48 (1963)
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275 (1951)
31. McArdle B: Myopathy due to a Defect in Muscle Glycogen Breakdown. *Clin. Sci.* 10, 13 (1951)
32. Mommaerts WFHM, Illingworth B, Pearson CM, Guillary RJ, Seraydarian K: A Functional Disorder of Muscle associated with the Absence of Phosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45, 791 - 797 (1959)
33. Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K: A new Variant of Glycogen Storage Disease Type I Probably due to a Defect in the Glucose-6-Phosphate Transport System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1360 -1364 (1978)
34. Narisawa K, Tada K: Neutropenia in Type Ib Glycogen Storage Disease.
35. Parker P, Burr I, Slonim A, Ghishan FK, Greene H: Regression of Hepatic Adenomas in Type Ia Glycogen Storage Disease with Dietary Therapy. *Gastroent.* 81, 534 - 536 (1981)
36. Pompe JC: Over Idiopathische Hypertrofie van het hart. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 76, 304 - 311 (1932)

37. Reczek PR, Villee CA: A Purification of Microsomal Glucose-6-Phosphatase from Human Tissue.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1158 - 1165 (1982)
38. Roe T, Schonfeld N, Thomas D, Gilsanz V, Atkinson J, Isaacs H: Regional Enteritis and Glycogen Storage Disease Type Ib.
The Lancet 1, 1077 (1984)
39. Schaub J: Hereditäre Speicherkrankheiten der Leber.
Leber Magen Darm 9, 227 - 234 (1979)
40. Sidbury JB, Cornblath M, Fisher J, House E: Glycogen in Erythrocytes of Patients with Glycogen Storage Disease.
Pediatrics 27, 103 - 111 (1961)
41. Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS: The Metabolic Basis of Inherited Diseases.
New York, McGraw Hill (1983)
42. Stanley CA, Mills JL, Baker L: Intragastric Feeding in Type I Glycogen Storage Disease: Factors Affecting the Control of Lactic Acidemia.
Pediatr. Res. 15, 1504 - 1508 (1981)
43. Tamura S, Dubler RE, Larner J: Stimulation of Maximal Intracellular Insulin Action on Glycogen Synthase by Preincubation of Adipocytes with Adenosine-5-Triphosphate.
J. Biol. Chem. 258, 719 - 724 (1983)
44. Tanaka K, Shimazu S, Oya N, Tornisawa M, Kusunoki T, Soyama K, Ono E: Muscular Form of Glycogenosis Type II (Pompe's Disease).
Pediatrics 63, 124 - 129 (1979)
45. Tarui S: Phosphofructokinase Deficiency in Skeletal Muscle. A new Type of Glycogenosis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 517 (1965)

46. Thomas JA, Schender KK, Larner J: A Rapid Filter Paper Assay for UDPglucose-Glycogen Glycosyltransferase, including an improved Biosynthesis of UDP-¹⁴C-Glucose. *Analyt. Biochem.* 25, 486 - 499 (1968)
47. Vietor KW, Havsteen B, Harms D, Busse H, Heyne K: Ethanolaminosis: A newly Recognized, Generalized Storage Disease with Cardiomegalie, Cerebral Dysfunction and Early Death. *Eur. J. Pediatr.* 126, 61 - 75 (1977)
48. Williams HE, Kendig EM, Field JB: Leukocyte Debranching Enzyme in Glycogen Storage Disease. *J. Clin. Invest.* 42, 656 - 660 (1963)
49. Zimmermann CP, Gold AM: Glycogen Branching Enzyme in Lafora Myoclonus Epilepsy. *Biochem. Med.* 28, 83 - 93 (1982)

Lebenslauf

- 1957 geboren in Oberammergau als Sohn des Bundesbahn-
beamten Hans Kopp und seiner Frau Anna Kopp, geb.
Lang
- 1963-67 Volksschule in Altenau/Bay
- 1967-76 Gymnasium in Murnau
- 1976-77 Grundwehrdienst in Murnau
- 1977-78 Studium der Physik an der LMU München
- 1978 Beginn des Medizinstudiums an der LMU München
- 1980 Ärztliche Vorprüfung
- 1981 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1983 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1984 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1985 Beginn der Weiterbildung zum Arzt für Kinderheil-
kunde an der Kinder- und Rheumakinderklinik
Garmisch - Partenkirchen

